

Actividad biológica de hongos endófitos presentes en dos plantas medicinales chuquirahua (*Chuquiragua jussieui* J. F. Gmel) y ñachag (*Bidens andicola* Kunth)

Ernesto Delgado Fernández^{1*}, Santiago Vásquez Matute, Ximena Icaza Samaniego

¹ Laboratorio de Biotecnología, Campus Juan Lunardi, Universidad Politécnica Salesiana, Paute, Ecuador.

* Autor para correspondencia: mdelgado@ups.edu.ec

Resumen

La presente es una investigación acerca de la actividad biológica de hongos endófitos aislados de dos plantas consideradas medicinales *Chuquiragua jussieui* J.F. Gmel y *Bidens andicola* Kunth, recolectadas en tres zonas diferentes del parque nacional Cajas de Cuenca, Ecuador. Los taxa fúngicos más frecuentes fueron: *Alternaria*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Phoma*, *Coelomycetes*, el mayor porcentaje de infestación correspondió a los denominados «*Mycelia sterilia*» (micelios estériles) siendo de particular interés su actividad antagonista. Se evaluó *in vitro*, la interacción antagonica de estos hongos endófitos, frente, a hongos fitopatógenos: *Botrytis cinerea*, *Phragmidium disciflorum*, *Colletotrichum gloesporoides*, *Oidium* Sp. *Guignardia citricarpa*, *Pestalotia* Sp. *Plasmopara viticola*, *Pythium* Sp. *Taphrina deformans*, *Fumago* Sp. *Monilia roreri*, *Ceratocystis fimbriata*, *Bremia lactucae*. Los resultados más prometedores se evidenciaron en aislados de «*Mycelia sterilia*» (estructuras no esporificantes) con un porcentaje del 89,1% frente al *Colletotrichum gloesporoides* agente causal de la antracnosis en el tomate de árbol. Además se hizo el análisis *in vitro* frente a bacterias fitopatógenas de los géneros: *Erwinia* Sp. *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas* Sp. y *Xanthomonas* Sp. Algunas cepas de hongos endófitos de los taxa mencionados, presentaron actividad antagonista, el objetivo de esta investigación y análisis es determinar los niveles y porcentajes de antagonismo, para el uso de los hongos endófitos en el control de enfermedades fitopatógenas causadas por hongos y bacterias. Los resultados son muy satisfactorios, según lo encontrado.

Palabras clave: Hongo endófito, cultivo dual, antagonismo.

Abstract

The present investigation about the biological activity of isolated endophytic fungi in two plants considered medicinal, *Chuquiragua jussieui* J.F. Gmel y *Bidens Andicola* Kunth, collected in three different areas of the Cajas National Park in Cuenca, Ecuador. The most frequent fungi taxa were: *Alternaria*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Phoma*, *Coelomycetes*. The highest percentage corresponded to the so-called «*Mycelia sterilia*» (sterile mycelia), their antagonist activity being of particular interest. The antagonist activity of these endophytic fungi was evaluated *in vitro* as compared to that of phyto-pathogenic fungi: *Botrytis Cinerea*, *Phragmidium Disciflorum*, *Colletotrichum Gloesporoides*, *Oidium* Sp. *Guignardia Citricarpa*, *Pestalotia* Sp. *Plasmopara Viticola*, *Pythium* Sp. *Taphrina Deformans*, *Fumago* Sp. *Monilia Roreri*, *Ceratocystis Fimbriata*, *Bremia Lactucae*. The most promising results were evidenced in isolated «*Mycelia sterilia*» (non-spore-producing structures) with a percentage of 89,1% as compared to *Colletotrichum Gloesporoides*, causal agent of anthracnose in tree tomatoes. Besides, *in vitro* analysis was conducted for phyto-pathogenic bacteria such as: *Erwinia* Sp. *Agrobacterium Tumefaciens*, *Pseudomonas* Sp. y *Xanthomonas* Sp. Most of the fungi analyzed here showed antagonist activity, including some endophytic fungi of the above-mentioned taxa. The purpose was to determine the levels and percentages of antagonist activity for the use of endophytic fungi in the control of phyto-pathogenic diseases caused by fungi and bacteria. The outcomes of this research are promising in this sense.

Key words: endophytic fungi, dual cultivation, antagonism.

Introducción

El propósito de esta investigación fue el estudio de una especie de hongos denominados endófitos, aislados de dos plantas, consideradas ancestralmente como medicinales, *Chuquiragua jussieui* y *Bidens andicola* Kunth, plantas nativas del Parque Nacional El Cajas en Cuenca, Ecuador. Se pretende determinar la actividad biológica, mediante análisis *in vitro* utilizando como técnica cultivos duales, se busca, analizar, su interacción antagonista frente a hongos y bacterias fitopatógenas. Para entender la temática necesariamente debemos tener un concepto claro de lo que es un hongo endófito, podemos decir que conceptualmente la palabra endófito se deriva del griego *endon* cuyo significado es dentro y *phyte* que significa planta. El primero en definir el término endófito fue De Bary en 1866 aunque, en 1971 se definió al endofitismo como el estado de un organismo que vive en el interior de otro, en contraposición a la condición de hepifitismo. Carroll, en 1986, hizo su definición de los hongos endófitos como endosimbiontes y excluyó de este grupo los hongos patógenos y asociaciones de micorrizas. En 1994, Wennstrom no fue el único en polemizar sobre el uso de la palabra y propone una redefinición de endófito: utilizar la definición original, un ser vivo que mora en el organismo interno de otro. Otro concepto nos dice que estos hongos viven asintóticamente en la planta, la mayor parte de su ciclo vital, tienen esporulación limitada en breves periodos y en algunos casos pueden estimular el desarrollo y la fuerza competitiva del huésped. Wilson, en 1995, hace una revisión sobre el significado del término y define a los hongos endófitos como los que invaden los tejidos de plantas vivas, pueden ser sistémicos, asistémicos o mutualísticos. En cambio, otros se manifiestan como parásitos o algo similar, pudiendo vivir en la planta durante su ciclo vital o parte de él, esto excluye a las asociaciones de micorrizas, se incluye a hongos que son patógenos que no representan síntomas en el tejido. Dreyfuss afirmó que los hongos endófitos representan la más grande reserva de especie fungina, pero es necesario recordar que es un campo de investigación relativamente nuevo, y que seguramente todos los estudios que se llevan a cabo contribuirán a una mayor comprensión acerca del tema. Se han realizado muy pocos estudios sobre los hongos endófitos, se han realizado muy pocos, de lo que se conoce, existen trabajos científicos en las zonas tropicales (Dreyfuss y Petrini, 1984; Rodrigues y Samuels, 1990; Rodrigues and Samuels, 1992). Debido a la gran biodiversidad, al menos en nuestro país, resulta demasiado extenso el trabajo, pero también se conoce de trabajos

que se llevan a cabo en plantas que viven en ambientes extremos, como los desiertos y la Antártica. El conocimiento acerca de los hongos endófitos, permitirá aplicaciones de gran importancia, como el control biológico de plagas y enfermedades, pero también dependerá de la capacidad y el potencial para producir metabolitos secundarios, que pueden ser utilizables en el campo médico, fitopatológico e industrial, cualquiera sea el uso que se pueda dar, son modelos de investigación, de la interacción huésped-parásito y la evolución del sistema natural. Las gramináceas igualmente son objeto de gran estudio, para determinar la causa del impacto ecológico que tiene el huésped sobre la comunidad vegetal. Los primeros estudios en este sentido, se dieron en 1941 (Neil, 1941) determinando la asociación entre la *Festuca Orundinaceae* y el hongo endófito *Epichloe typhina* y *Acremonium coenophialum*, desde aquí se parte para futuros estudios en el área, para llegar a determinar la relación hongo-vegetal. En la bibliografía analizada, no se encuentran datos acerca del análisis antagónico *in vitro* de hongos endófitos de dos plantas *Chuquiragua jussieui* y *Bidens andicola* Kunth, frente a hongos fitopatógenos, hongos endófitos y bacterias fitopatógenas. La presente investigación, se fundamenta en la capacidad antagónica de estos. El problema más grande dentro de patología vegetal, son los hongos. ¿Se podría considerar los hongos endófitos como antagonistas de hongos y bacterias fitopatógenas? Mediante cultivos duales *in vitro*, se logra determinar los porcentajes de inhibición de los hongos endófitos, con respecto a hongos y bacterias comunes, causantes de enfermedades en diferentes cultivos. Determinar la actividad biológica de los hongos endófitos y estudiar su interacción antagonista frente a hongos fitopatógenos y bacterias, con el propósito de indagar el uso de estos microorganismos para el control biológico de enfermedades fitopatológicas, es el propósito de esta investigación.

Materiales y métodos

2.1 Área de muestreo

La investigación, se lleva a cabo en el parque nacional el Cajas, se aislaron hongos endófitos de dos plantas consideradas medicinales *Chuquiragua jussieui* J.F. Gmel y *Bidens andicola* Kunth. Para la investigación, se consideran tres zonas: Zona 1 coordenadas UTM. 17 696532 E; 9692756 N; altitud 3972msnm, coordenadas LAT. LONG. 02° 46.701 S; 079° 13.9270 O; altitud 3972 msnm.; zona 2 coordenadas UTM. 17 699313 E; 9691739 N; Altitud 3892 msnm, coordenadas LAT. LOG. 02°47.251 S; 079°12.424 O; Altitud 3892 MSNM;

Zona 3 coordenadas UTM. 17 700210 E; 9692189 N; Altitud 3691 msnm, coordenadas LAT. LONG. 02°47.005 S; 079°11.942 O; altitud 3693 MSNM.

2.2 Insolamamiento y Taxonomía de hongos endófitos

2.2.1 Esterilización de la muestra

La esterilización de las muestras, de cualquier parte de la planta, comienza con el lavado en agua corriente, luego se procede a la esterilización superficial siguiendo métodos y recomendaciones establecidas, (Rodríguez, 1992); se consideran partes del vegetal, sanas y libres de enfermedades. Se realizaron inmersiones en etanol (C_2H_5OH) al 75% e hipoclorito de sodio ($NaClO$) con una concentración del 3,41% dependiendo del tipo de material vegetal, en este caso, las muestras de *Chuquiragua jussieui* J.F.Gmel, por disponer de hojas robustas, la esterilización, se realizó con un tiempo de tres minutos en hipoclorito de sodio y un minuto en etanol. Con las muestras de *Bidens andicola* Kunth, por disponer de hojas y flores sutiles, se tomó en cuenta un tiempo de treinta segundos para el hipoclorito de sodio y treinta segundos para el etanol. Teniendo en cuenta condiciones estériles, se cortan muestras del vegetal de (3-4 mm²) tratando de cortar entre la nervadura central y el borde de la hoja, en el caso del vegetal *Chuquiragua jussieui*, con respecto a la *Bidens andicola*, se tomaron muestras de la flor por ser la parte del vegetal considerada con propiedades medicinales, los cortes del vegetal, se inocularon en cajas Petri (100 x 15 mm) con Agar extracto de malta, (MEA; Difco). 5 muestras por caja, luego se insolaron en cajas petri de igual tamaño con el objeto de obtener cultivos puros, y finalmente el mismo procedimiento en tubos de ensayo con PDA Difco a pico de clarín, para evitar el desarrollo de bacterias se utilizó cloranfenicol 250 mg/litro. El desarrollo de la colonia fungina, se controla diariamente, con la ayuda de un estéreo microscopio; la identificación y morfometría se lleva a cabo a través de un microscopio, mediante la preparación de placas, utilizando como tinción lacto fenol de Amann o lacto fucsina ácida. El lacto fenol es incoloro y permite ver la coloración propia de los micromicetes, al contrario, la fucsina ácida es un colorante que evidencia más intensamente las características estructurales funginas. La identificación de los hongos y su clasificación se hace por medio de claves y referencias bibliográficas, con la colaboración del Dipartimento di Ecología del Territorio - Università di Pavia – Italia. El diseño experimental usado es la prueba chi cuadrado, para determinar los niveles de infestación de hongos endófitos en las tres zonas consideradas.

2.3 Insolamamiento y Taxonomía de Hongos Fitopatógenos

La caracterización de hongos fitopatógenos de mayor incidencia en la zona del austro, como en la región Costa, fue también el propósito de esta investigación, además, aislar e identificar bacterias fitopatógenas asociadas al cultivo del babaco *Carica pentagona*. La caracterización morfológica se basa principalmente en la estructura, y composición (conidios, conidióforos, etcétera.) (Barnett y Hunter, 1998). Para el aislamiento del patógeno y la caracterización, se toman muestras del vegetal, luego se lavan con agua destilada, se cortan muestras del vegetal afectado por la enfermedad, las muestras se toman del borde de la hoja, en la cámara de flujo laminar, se procede a desinfectar las muestras, con hipoclorito de sodio al 4%, etanol al 75% por un tiempo variable. Luego, son colocadas en un medio de cultivo para hongos, en este caso se utilizó PDA (Difco) en cajas petri de (100 x 15 mm). Se colocaron 5 muestras en cada caja, posteriormente, se hace el control del desarrollo (esporificación), siguiendo el procedimiento detallado anteriormente, el objetivo de este procedimiento, es obtener cultivos puros, en este caso de hongos fitopatógenos que, posteriormente, serán identificados y clasificados taxonómicamente, mediante el uso de un microscopio y la elaboración de placas. La clasificación taxonómica se hace por medio de claves, referencias bibliográficas y manuales de identificación específicos para los géneros en estudio.

2.4 Valoración in vitro de la actividad de antagonismo cultivo dual hongo endófito-hongo fitopatógeno.

Para el empleo del test, se parte de cultivos monospóricos, se emplea el método de cultivos duales, con puntales estériles, se toman fragmentos de micelio de 4 a 5 mm de diámetro, éstos son tomados de los cultivos monospóricos en desarrollo, en un terreno PDA, e inoculados en una cámara de flujo laminar, en cajas petri de (100 x 15 mm) que contienen el mismo terreno. Los dos micelios a antagonizar son inoculados a 4 cm de distancia (2,5 cm de distancia del borde de la caja). En cada prueba se lleva una caja de control, que se obtiene del mismo cultivo madre (monospórico), es inoculado sobre PDA a la distancia de 2,5 cm del borde de la caja petri. Todos los test se llevan a cabo en duplicado, en este caso los cultivos se mantiene a temperatura ambiente y se realizan mediciones diarias del radio dirigido hacia el centro de la caja. La inhibición de los hongos fitopatógenos opuestos a los hongos endófitos se expresa como porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio.

32 Delgado, Vásquez e Icaza

$$\text{Inibición (\%)} = 100 \times (R - r) / R$$

Donde R y r, respectivamente, son el radio dirigido hacia el centro de la caja en el control y en el cultivo dual (Watanabe, 1980) y propuesto por otros autores (Dalla Valle y D'Aurelio Zechini, 1989; Pearce, 1990; Varese y Luppi-Mosca, 1991).

2.5 Cultivo dual hongo-bacteria

La metodología es muy parecida, del margen de colonias funginas en crecimiento sobre terreno PDA, son cortados y retirados, con puntales estériles, discos de micelio de 4 mm de diámetro, luego son inoculados en cajas de 9 cm de diámetro que contienen 20 ml del mismo terreno, una distancia de 2,6 cm del margen de la caja, mientras que a una distancia de 3,7 cm se inocula una suspensión bacterica de 0,5 ml.

2.6 Análisis microscópico

Las pruebas duales se completan con el análisis microscópico de fragmentos de micelio de las colonias en contacto y de las áreas marginales, para determinar las posibles alteraciones morfológicas de los microorganismos.

Resultados

3.1 Taxonomía hongos endófitos

3.1.1 Tasa de infestación "Chuquiragua jussieui"

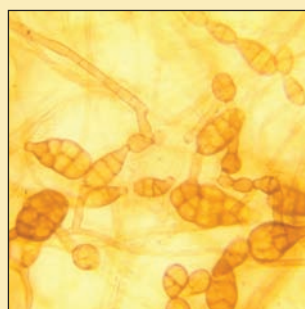
Los taxa de hongos encontrados en las dos especies de plantas investigadas se reporta por el porcentaje referido a la incidencia del hongo en la planta, se calculó sobre el total de fragmentos de hojas analizados por especie vegetal. Los principales taxa aislados, fueron: *Mycelia sterilia* (micelios sin fructificaciones), *Alternaria*, algunos representantes de los *Coelomycetes* y algunos hongos ambientales comunes (*Acremonium*, *Fusarium*, *Phoma*) algunos hongos aislados se consideran patógenos, nos referimos a los géneros *Alternaria* y *Fusarium*, que se reporta, acerca de su patogenicidad en diversos hospedadores (tanto en plantas silvestres como cultivadas), (Sridhar y Raviraja, 1995). El grupo fúngico más interesante es el que corresponde a los micelios estériles, éstos se aislaron en las dos plantas medicinales investigadas. El aislamiento de micelios estériles, es quizás uno de los resultados más interesantes de la presente investigación micológica, que necesita ser producto de investigación, la tasa de infestación es del 48,33%. un porcentaje del 33,33% corresponde a hongos que corresponden a micelios estériles, se considera un porcentaje elevado

de acuerdo a la tasa de infestación, el 18,33% corresponde a muestras no infestadas con hongos.

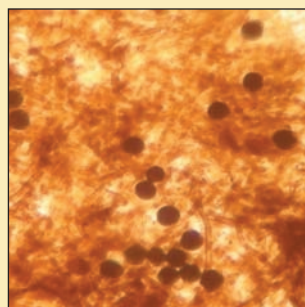
3.1.2 Tasa de infestación "ñachag" *Bidens andicola* Kunth

Se identifican 5 géneros de hongos diferentes: *Alternaria* spp; *Cladosporium* spp.; *Coelomycetes*, *Fusarium* spp; *Nigrospora* Sp. La tasa de infestación más alta se da con el género *Fusarium* con un porcentaje del 24,49%; el género *Nigrospora* se encuentra en un porcentaje del 16,33%; hongos con micelios estériles, corresponde el 40,33% mientras, que la muestras no infestadas corresponde 50,41%.

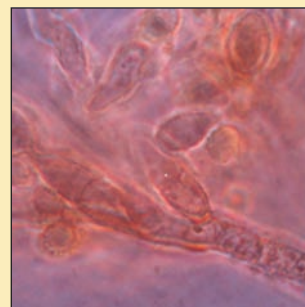
Se muestran fotos al microscopio de hongos endófitos y fitopatógenos de cada uno de los géneros



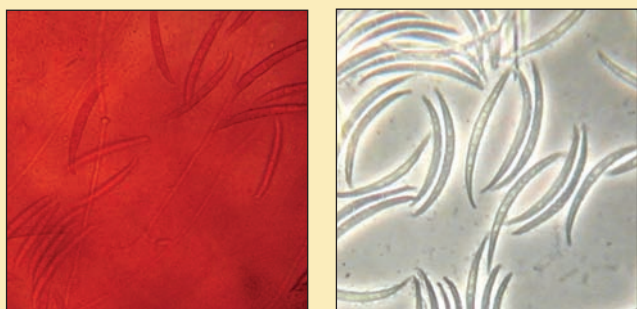
Figuras 1 y 2. Hongos endófitos en el género *Alternaria* Sp. Fuente: Ernesto Delgado.



Figuras 3 y 4. Hongos endófitos en el género *Nigrospora* Sp. Fuente: Ernesto Delgado.



Figuras 5 y 6. Hongos endófitos en el género *Cladosporium* Sp. Fuente: Ernesto Delgado.

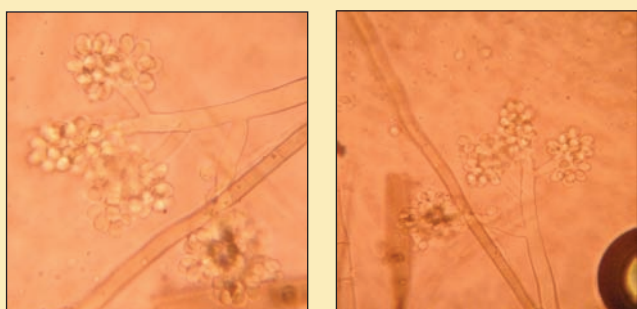


Figuras 7 y 8. Hongos endófitos en el género *Fusarium* Sp.
Fuente: Ernesto Delgado.

3.2. Hongos fitopatógenos aislados y clasificados taxonómicamente

3.2.1 Fitopatología I.

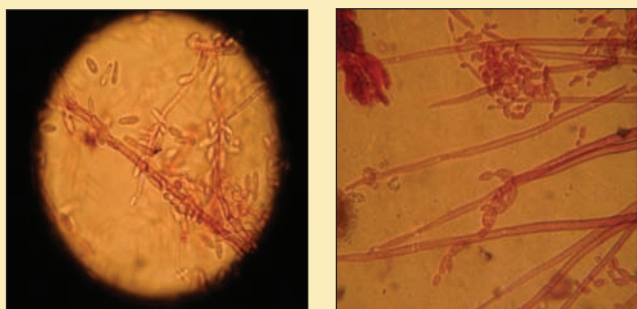
Botrytis cinerea (Figuras 9 y 10). Agente causal de la podredumbre gris (*Rosa* Sp.)



Figuras 9 y 10. Estructura del hongo *Botrytis cinerea* al microscopio. Fuente: Ernesto Delgado.

3.2.2 Fitopatología II.

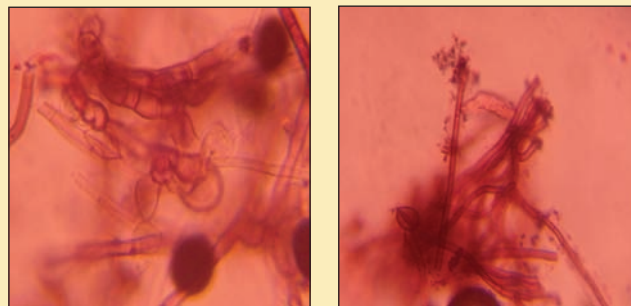
Antracnosis (Figuras 11 y 12) (*Colletotrichum gloesporoides*) en tomate de árbol *Cyphomandra betacea* (Cav) Sendt. Solanaceae.



Figuras 11 y 12. Estructura del hongo *Colletotrichum gloesporoides* al microscopio. Fuente: Ernesto Delgado.

3.2.3 Fitopatología III.

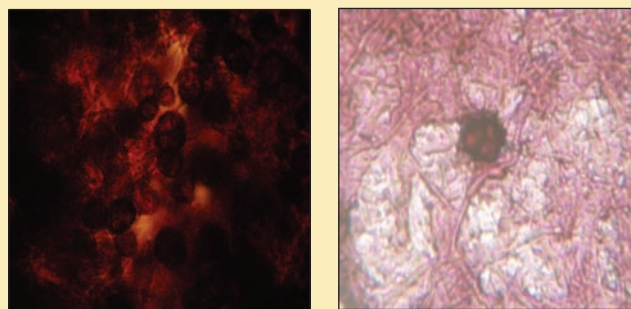
Mildiu de la vid (Figuras 13 y 14) (*Plasmopara viticola*).



Figuras 13 y 14. Estructura del hongo *Plasmopara viticola* al microscopio. Fuente: Ernesto Delgado.

3.2.4 Fitopatología IV.

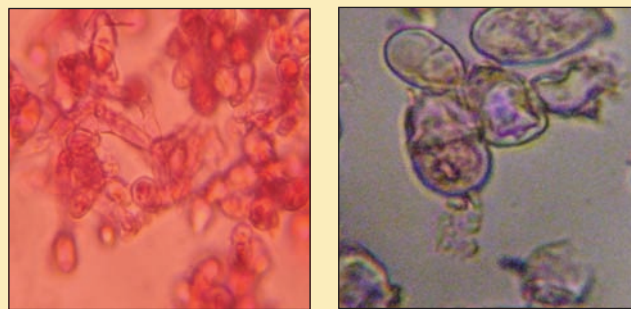
Pythium (*Pythium*. Sp) El *Pythium* llamado tizón o mancha de grasa, El género *Pythium* genera, pudriciones de semilla y raíces, Se aisló el hongo del clavel (*Dianthus caryophyllus*)



Figuras 15 y 16. Estructura del hongo (*Pythium*. Sp) al microscopio. Fuente: Ernesto Delgado.

3.2.5 Fitopatología V.

Taphrina deformans

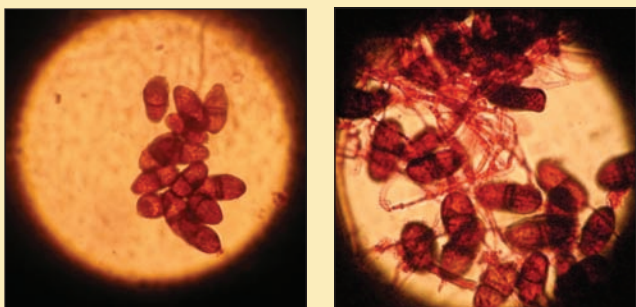


Figuras 17 y 18. Estructura del hongo *Taphrina deformans* al microscopio. Fuente: Ernesto Delgado.

34 Delgado, Vásquez e Icaza

3.2.6 Fitopatología VI.

Fumago Sp negrilla en cacao- especies de hongos que forman una película negra, en hojas y partes de la planta. El agente causal de la negrilla en cacao es un hongo imperfecto.



Figuras 19 y 20. Estructura del hongo *Fumago Sp.* al microscopio. Fuente: Ernesto Delgado.

3.2.7 Fitopatología VII.

Guignardia citricarpa Kielly mancha tardía en “*Citrus cinensis*” (naranja).

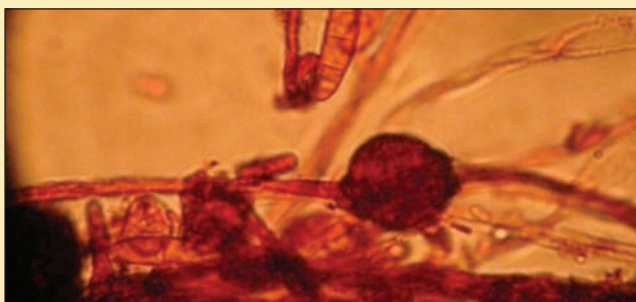
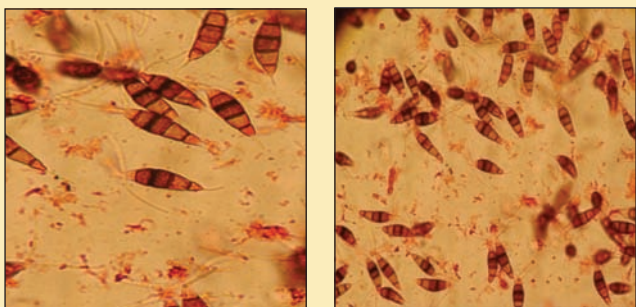


Figura 21. Estructura del hongo *Guignardia citricarpa* Kielly al microscopio. Fuente: Ernesto Delgado.

3.2.8 Fitopatología VIII.

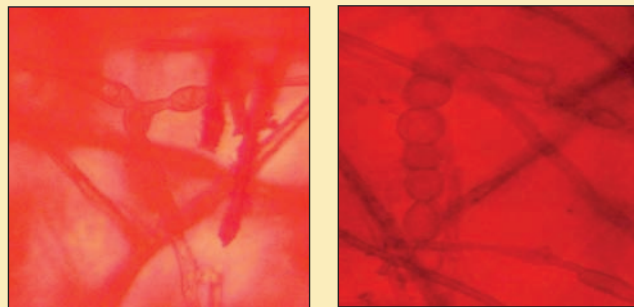
Género *Pestalotia Sp.* es la especie causante del marchitamiento y muerte de hojas y ramas jóvenes, se reconoce la presencia de más de 200 especies de este género, es común su presencia en plantas de banano.



Figuras 22 y 23. Estructura del hongo *Pestalotia Sp.* al microscopio. Fuente: Ernesto Delgado.

3.2.9 Fitopatología IX.

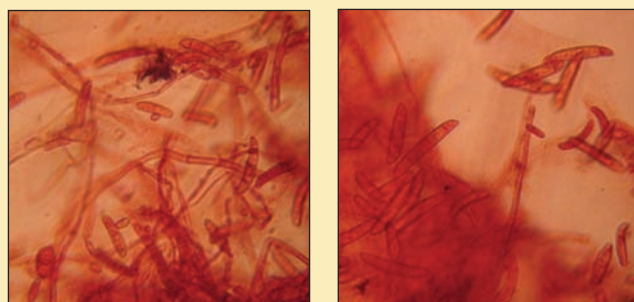
Moniliasis, *Monilia roreri* (Figuras 24 y 25) también conocida como Pudrición acuosa, Helada, Mancha, Ceniza o Enfermedad de Quevedo, está causada por el hongo *Monilia (Moniliophthora) roreri* E. (C. y P.)



Figuras 24 y 25. Estructura del hongo *Monilia, Moniliophthora roreri* E. (C. y P.) al microscopio. Fuente: Ernesto Delgado.

3.2.10 Fitopatología X.

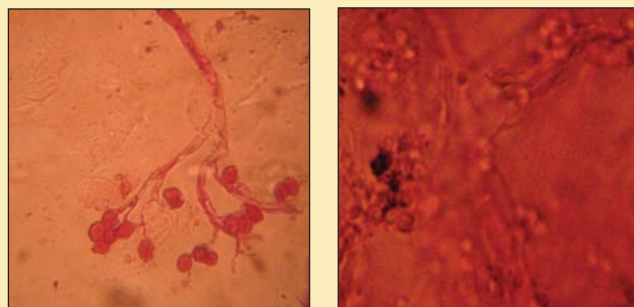
Ceratocystis fimbriata Enfermedad del machete (Figuras 26 y 27).



Figuras 26 y 27. Estructura del hongo *Ceratocystis fimbriata* al microscopio. Fuente: Ernesto Delgado.

3.2.11 Fitopatología XI.

Bremia lactucae (Figuras 28 y 29).



Figuras 28 y 29. Estructura del hongo *Bremia lactucae* al microscopio. Fuente: Ernesto Delgado.

3.3 Resultados de Valoración in vitro de la actividad de antagonismo en cultivos duales

Hongo endófito *Colletotrichum gloesporoides* (Figura 30), los resultados de las mediciones diarias en centímetros del radio dirigido hacia el centro de la caja se presentan (Tabla 1). A = Hongo endófito; R= Caja de control. Así mismo se presentan los porcentajes de inhibición (Tabla 2). En este caso el porcentaje más alto de inhibición se da con los hongos endófitos A7 con el 73,9% y Ax con el 89,1%.

Figura 30. Foto cultivo dual hongo endófito–hongo *Colletotrichum gloesporoides*. Fuente: Ernesto Delgado.

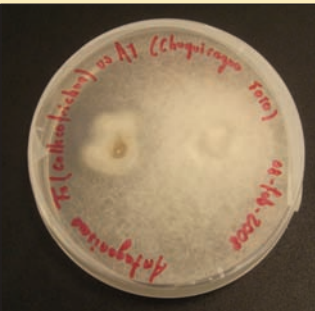


Tabla 1. Radio dirigido hacia el centro de la caja hongo endófito–hongo *Colletotrichum gloesporoides*. R= Caja de control.

FITOPATOLOGÍA: <i>Colletotrichum gloesporoides</i>														
	11/02/08	12/02/08	13/02/08	14/02/08	15/02/08	18/02/08	19/02/08	20/02/08	22/02/08	25/02/08	27/02/08	28/02/08	29/02/08	03/03/08
R	0,7	1,0	1,3	1,7	1,6	2,4	2,6	2,6	2,7	2,7	2,8	2,7	2,8	4,6
A1	0,7	1,0	1,3	1,6	1,6	1,7	1,7	1,7	1,6	1,6	1,8	1,5	1,6	1,5
A2	0,6	1,0	1,3	1,6	1,7	1,8	1,8	1,8	1,7	1,7	1,8	1,7	1,8	1,8
A3	0,6	0,8	1,1	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
A4	0,7	0,8	1,3	1,4	1,4	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4	1,2	1,3	1,5
A5	0,6	1,0	1,2	1,5	1,5	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,8	1,7
A6	0,8	1,2	1,7	1,8	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
A7	0,5	0,5	0,6	0,7	1,0	0,9	1,2	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
A8	0,7	1,0	1,3	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,5	1,6	1,6	1,5	1,5	1,6
Fx	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

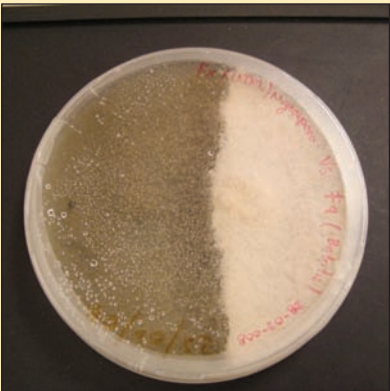
3.4 Resultados valoración in vitro de la actividad de antagonismo

3.4.1 Cultivos duales hongo endófito *Botrytis cinérea*.

Se presenta el cultivo dual en la (Figura 31), el radio dirigido hacia el centro de la caja (Tabla 3) medido en centímetros, en los cultivos duales a partir del 28 de febrero del 2008, A = Hongo endófito; R= Caja de control.

Además, se incluye el porcentaje de inhibición (Tabla 4), en este caso el porcentaje más alto se da con el hongo endófito codificado como A13 con el 70,2%.

Figura 31. Foto cultivo dual hongo endófito – hongo *Botrytis cinérea*. Fuente: Ernesto Delgado.



36 Delgado, Vásquez e Icaza

Tabla 2. Porcentaje de inhibición del *Colletotrichum gloesporoides*. En este caso el porcentaje más alto de inhibición se da con los hongos endófitos A7 con el 73,9% y Ax con el 89,1%.

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN <i>Colletotrichum gloesporoides</i>														
	11/02/08	12/02/08	13/02/08	14/02/08	15/02/08	18/02/08	19/02/08	20/02/08	22/02/08	25/02/08	27/02/08	28/02/08	29/02/08	03/03/08
A1	0,0	0,0	0,0	5,9	0,0	29,2	34,6	34,6	40,7	40,7	35,7	44,4	42,9	67,4
A2	14,3	0,0	0,0	5,9	-6,2	25,0	30,8	30,8	37,0	37,0	35,7	37,0	35,7	60,9
A3	14,3	20,0	15,4	29,4	25,0	45,8	50,0	50,0	51,9	51,9	53,6	51,9	53,6	71,7
A4	0,0	20,0	0,0	17,6	12,5	37,5	42,3	46,2	48,1	48,1	50,0	55,6	53,6	67,4
A5	14,3	0,0	7,7	11,8	6,3	29,2	34,6	34,6	37,0	37,0	39,3	37,0	35,7	63,0
A6	-14,3	-20,0	-30,8	-5,9	-25,0	16,7	23,1	23,1	25,9	25,9	28,6	25,9	28,6	56,5
A7	28,6	50,0	53,8	58,8	37,5	62,5	53,8	57,7	59,3	55,6	57,1	55,6	57,1	73,9
A8	0,0	0,0	0,0	5,9	6,3	33,3	38,5	42,3	44,4	40,7	42,9	44,4	46,4	65,2
Ax	28,6	50,0	61,5	70,6	68,8	79,2	84,6	84,6	81,5	81,5	82,1	81,5	82,1	89,1

Tabla 3. Radio dirigido hacia el centro de la caja hongo endófito–hongo *Botrytis cinerea*.

FITOPATOLOGÍA: <i>Botrytis cinerea</i>					
Análisis: 28 de febrero de 2008					
	03/03/08	04/03/08	05/03/08	06/03/08	18/03/08
R	4,6	5,0	5,5	5,7	5,7
A1	2,3	2,3	2,3	2,3	2,0
A2	2,5	2,5	2,5	2,5	2,3
A3	2,2	2,3	2,4	2,4	2,2
A4	2,0	2,0	2,0	2,0	2,1
A5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
A6	2,3	2,3	2,5	2,	2,4
A7	2,7	2,7	2,6	2,6	2,2
A8	2,6	2,6	2,6	2,6	2,0
A9	2,5	2,8	2,8	2,8	2,5
A10	2,0	2,1	2,2	2,2	2,0
A12	2,4	2,6	2,6	2,6	2,5
I3	1,9	1,5	1,5	1,8	1,7
A14	2,0	2,0	1,9	1,9	2,0
AX	2,1	2,0	1,8	1,8	2,0

Tabla 4. Porcentaje de inhibición hongo endófito–hongo *Botrytis cinerea*, el mayor porcentaje se da con el endófito A13 con un 70,2%.

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN <i>Botrytis cinerea</i>					
A1	50,0	54,0	58,2	59,6	64,9
A2	45,7	50,0	54,5	56,1	59,6
A3	52,2	54,0	56,4	57,9	61,4
A4	56,5	60,0	63,6	64,9	63,2
A5	56,5	60,0	63,6	64,9	64,9
A6	50,0	54,0	54,5	56,1	57,9
A7	41,3	46,0	52,7	54,4	61,4
A8	43,5	48,0	52,7	54,4	64,9
A9	45,7	44,0	49,1	50,9	56,1
A10	56,5	58,0	60,0	61,4	64,9
A12	47,8	48,0	52,7	54,4	56,1
A13	58,7	70,0	72,7	68,4	70,2
A14	56,5	60,0	65,5	66,7	64,9
AX	54,3	60,0	67,3	68,4	64,9

3.4.2 Cultivos Duales Hongo Endófito *Plasmophora viticola*

Se presenta el cultivo (Figura 32), la medición en centímetros de los radios, en los cultivos duales, a partir del 14 de febrero de 2008, (Tabla 5) A= Hongo endófito; R= Caja de control. Se incluyen asimismo los porcentajes de inhibición (Tabla 6). En este caso el porcentaje más alto de inhibición se da con los hongos endófitos A10 con el 82,89% y A12 con el 82,8%.

3.4.3 Hongo Endófito *Pythium spp.*

El cultivo de este hogo se presenta (Figura 33) incluyendo la evolución de radios de los cultivos (Tabla 7) y los porcentajes de inhibición (Tabla 8).

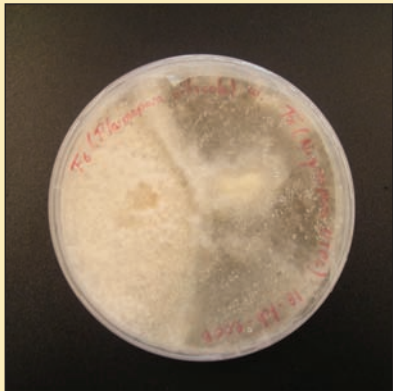


Figura 32. Foto cultivo dual hongo endófito *Plasmophora viticola*. Fuente: Ernesto Delgado.

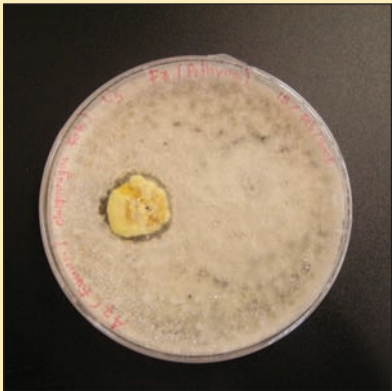


Figura 33. Foto cultivo dual hongo endófito – *Pythium spp.* Análisis 18 de febrero de 2008.

Tabla 5. Radios de los cultivos de la Plasmopara viticola.

FITOPATOLOGÍA: <i>Plasmopara viticola</i>								
FECHA. 14 de febrero de 2008								
	18/02/2008	19/02/2008	20/02/2008	22/02/2008	25/02/2008	27/02/2008	28/02/2008	29/02/2008
A1	4,3	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
A2	2,2	2,1	2,0	2,0	2,0	2,0	2,2	2,0
A3	2,1	2,1	2,0	2,0	2,0	2,1	2,7	2,1
A4	1,2	1,6	1,6	1,9	2,0	2,2	2,2	2,0
A5	2,0	2,0	1,8	1,9	1,7	1,8	1,5	2,0
A6	2,3	2,3	2,2	2,2	2,2	2,2	2,1	2,0
A7	2,0	1,9	1,8	1,8	1,9	2,0	1,0	2,5
A8	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
A9	2,2	2,2	2,3	1,7	1,8	1,9	2,0	1,8
A10	2,0	1,8	1,7	1,3	1,2	1,3	1,5	1,2
A11	2,0	2,0	2,0	1,3	1,1	1,0	2,0	1,0
A12	2,5	2,5	2,3	1,2	1,1	1,0	1,0	1,0
A13	1,5	1,5	1,7	1,5	1,2	1,2	1,5	1,4
A14	2,0	2,3	1,8	2,0	2,0	2,0	2,1	2,0
AX	1,8	1,8	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8

Tabla 6. Porcentajes de inhibición Plasmopara viticola.

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN: <i>Plasmopara viticola</i>								
A1	48,8	63,8	65,5	65,5	65,5	65,5	62,1	65,5
A2	51,2	63,8	65,5	65,5	65,5	63,8	53,4	63,8
A3	72,1	72,4	72,4	67,2	65,5	62,1	62,1	65,5
A4	53,5	65,5	69,0	67,2	70,7	69,0	74,1	65,5
A5	46,5	60,3	62,1	62,1	62,1	62,1	63,8	65,5
A6	53,5	67,2	69,0	69,0	67,2	65,5	82,8	56,9
A7	65,1	74,1	74,1	74,1	74,1	74,1	74,1	74,1
A8	48,8	62,1	60,3	70,7	69,0	67,2	65,5	69,0
A9	53,5	69,0	70,7	77,6	79,3	77,6	74,1	79,3
A10	53,5	65,5	65,5	77,6	81,0	82,8	65,5	82,8
A12	41,9	56,9	60,3	79,3	81,0	82,8	82,8	82,8
A13	65,1	74,1	70,7	74,1	79,3	79,3	74,1	75,9
A14	53,5	60,3	69,0	65,5	65,5	65,5	63,8	65,5
Ax	58,1	69,0	67,2	69,0	69,0	69,0	69,0	69,0

Tabla 7. Medición en centímetros de los radios, en los cultivos duales a partir del 14 de febrero de 2008,A= Hongo endófito; R= Caja de control

FITOPATOLOGÍA: <i>Pythium</i>										
Análisis: 18 de febrero de 2008										
	22/02/2008	25/02/2008	27/02/2008	28/02/2008	29/02/2008	03/03/2008	04/03/2008	05/03/2008	06/03/2008	07/03/2008
R	0,6	1,0	1,3	1,5	1,6	2,1	2,3	2,3	2,5	2,6
A1	0,6	1,1	1,2	1,3	1,4	1,8	1,5	1,4	1,3	1,3
A2	0,6	1,1	1,3	1,3	1,4	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5
A3	0,5	0,9	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0	0,9	1,1	0,9
A4	0,8	1,5	1,7	1,7	1,9	1,9	2,0	2,0	1,8	1,9
A5	0,6	1,0	1,2	1,2	1,3	1,6	1,9	1,9	2,1	2,0
A6	0,6	1,0	1,2	1,0	1,0	1,2	1,1	1,1	1,2	1,0
A7	0,5	1,0	0,7	0,6	1,0	0,8	0,6	0,7	0,8	0,7
A8	0,6	1,0	1,3	1,4	1,5	1,6	1,6	1,5	1,6	1,6
A9	0,5	1,0	1,2	1,3	1,2	1,3	1,3	1,2	1,4	
A10	0,6	0,9	1,2	1,4	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
A12	0,6	1,9	1,2	1,5	1,4	1,6	1,5	1,5	1,6	1,5
A13	0,6	1,0	1,1	1,3	1,0	1,0	1,5	0,8	1,8	1,0
A14	0,6	1,0	1,2	1,2	1,3	1,4	1,5	1,7	1,6	1,7
Ax	0,8	0,8	0,9	0,9	1,0	0,7	0,8	0,6	1,0	0,8

Tabla 8. Porcentajes de inhibición en *Pythium*. En este caso el porcentaje más alto de inhibición se da con los hongos endófitos A7 con el 73,1 % y FX con el 69,2%

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN: <i>Phytium</i>										
A1	0,0	-10,0	7,7	13,3	12,5	14,3	34,8	39,1	48,0	50,0
A2	0,0	-10,0	0,0	13,3	12,5	28,6	34,8	34,8	44,0	42,3
A3	16,7	10,0	23,1	40,0	37,5	47,6	56,5	60,9	56,0	65,4
A4	-33,3	-50,0	-30,8	-13,3	-18,8	9,5	13,0	13,0	28,0	26,9
A5	0,0	0,0	7,7	20,0	18,8	23,8	17,4	17,4	16,0	23,1
A6	0,0	0,0	7,7	33,3	37,5	42,9	52,2	52,2	52,0	61,5
A7	16,7	0,0	46,2	60,0	37,5	61,9	73,9	69,6	68,0	73,1
A8	0,0	0,0	0,0	6,7	6,3	23,8	30,4	34,8	36,0	38,5
A9	16,7	0,0	7,7	13,3	25,0	38,1	43,5	47,8	44,0	
A10	0,0	10,0	7,7	6,7	6,3	23,8	30,4	30,4	36,0	38,5
A12	0,0	-90,0	7,7	0,0	12,5	23,8	34,8	34,8	36,0	42,3
A13	0,0	0,0	15,4	13,3	37,5	52,4	34,8	65,2	28,0	61,5
A14	0,0	0,0	7,7	20,0	18,8	33,3	34,8	26,1	36,0	34,6
Fx	-33,3	20,0	30,8	40,0	37,5	66,7	65,2	73,9	60,0	69,2

3.4.5 Hongo Endófito *Monilia roreri*

El cultivo de este hongo se presenta en la Figura 35, como en casos anteriores se incluye la evolución de radios de los cultivos (Tabla 9) y los porcentajes de inhibición (Tabla 10).

Figura 35. Foto del hongo endófito, *Monilia roreri*.
Fuente: Ernesto Delgado.

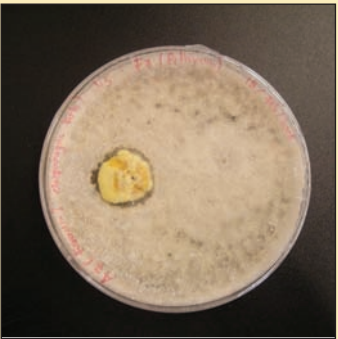


Tabla 9 Medición en centímetros de los radios, en los cultivos duales a partir del 9 de febrero de 2008, A= Hongo endófito; R= Caja de control

FITOPALOTOGÍA: <i>Monilia roreri</i>						
ANÁLISIS: 9 Febrero 2008						
	05/03/08	06/03/08	07/03/08	11/03/08	12/03/08	18/03/08
R	0,4	1,1	1,6	3,8	4,5	5,7
A1	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6	1,3
A2	0,8	0,5	0,6	0,7	0,8	2,4
A3	0,9	1,5		2,3	2,5	2,3
A4	0,7	1,1	1,4	1,6	1,8	1,8
A6	0,8	1,2	1,6	1,6	1,6	1,6
A7	0,6	1,1	1,3			2,0
A9	1,1	1,6	1,9	2,2	2,1	2,1
A10	0,6	0,9	1,0			
A12	0,9	1,6	1,7	2,5	2,5	2,5
A13	1,1	1,5	1,5	1,7	1,7	2,0
Fx	0,6	1,2	1,2	1,5	1,8	1,5

Tabla 10. Porcentajes de inhibición de la *Monilia roreri*. En este caso el porcentaje más alto de inhibición se da con el hongo endófito A7 con el 69,0%

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN <i>Monilia roreri</i>				
A1	6,3	26,7	63,6	62,1
A2	0,0	40,0	54,5	67,2
A3	-6,2	23,3	58,2	60,3
A4	-12,5	33,3	60,0	60,3
A5	0,0	16,7	54,5	55,2
A6	-6,2	43,3	54,5	56,9
A7	-12,5	50,0	67,3	69,0
A8	12,5	33,3	60,0	60,3
Ax	6,3	33,3	60,0	62,1

3.5 Pruebas de Interacción entre Hongos y Bacterias

Los resultados de la interacción antagónica de algunas de las cepas de hongos aislados frente a bacterias fitopatógenas, se presentan a continuación (Figuras 36 y 37)

3.5.1 Valoración in vitro de la actividad de antagonismo hongo endófito-bacteria *Erwinia Caratovora*.

Los resultados se representan como (-) no hay antagonismo y (+) se reporta antagonismo, de parte de los hongos endófitos (Tabla 11). Nótese el antagonismo en los endófitos A13,A7 y A5.

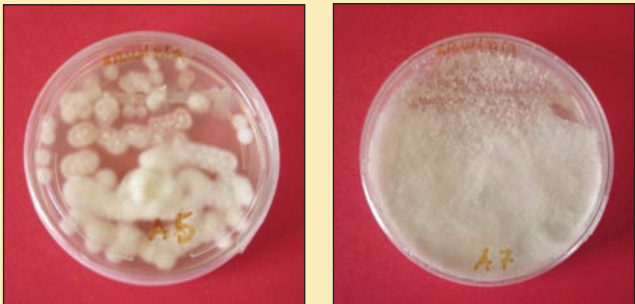


Figura 36. Fotos de la *Erwinia Caratovora*. Fuente: Ernesto Delgado.

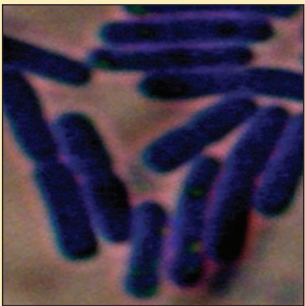
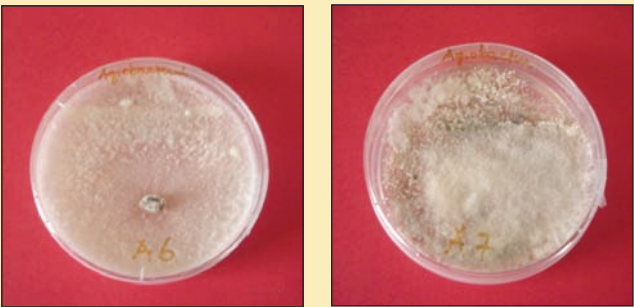


Figura 37. Foto al microscopio “*Erwinia caratovora*”. Fuente: Ernesto Delgado.

3.5.2 Valoración in vitro de la actividad de antagonismo hongo endófito-bacteria *Agrobacterium*

Igualmente, la interacción antagónica del hongo endófito-bacteria *Agrobacterium* se presenta en las Figuras 38 y 39, y las valoraciones en la Tabla 12.



Figuras 38. *Agrobacterium Sp. in vitro*. Fuente: Ernesto Delgado.

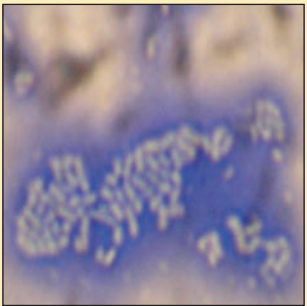


Figura 39. Foto al microscopio del “*Agrobacterium tumefaciens*”. Fuente: Ernesto Delgado.

Tabla 11. Valoración in vitro de la actividad de antagonismo de los hongos endófitos con la bacteria *Erwinia caratovora*.

BACTERIA: <i>Erwinia caratovora</i>	
Endófito A4	-
Endófito A13	+
Endófito AX	-
Endófito A7	+
Endófito A5	+
Endófito A2	-
Endófito A1	-

Tabla 12. Valoración in vitro del *Agrobacterium*.

BACTERIA: <i>Agrobacterium</i>	
Endófito A4	-
Endófito A13	+
Endófito AX	+
Endófito A1	-
Endófito A2	-
Endófito A5	+
Endófito A6	+
Endófito A7	+

3.5.3 Valoración *in vitro* de la actividad de antagonismo hongo endófito-bacteria *Xanthomonas*.

Se presenta en la Tabla 13 el antagonismo registrado en los endófitos A2, A5 y A6.

Tabla 13. Valoración *in vitro* del hongo endófito con la bacteria *Xanthomonas*.

BACTERIA: <i>Xanthomonas</i>	
Endófito A4	-
Endófito A13	-
Endófito AX	-
Endófito A2	+
Endófito A5	+
Endófito A6	+

3.5.4 Valoración *in vitro* de la actividad de antagonismo hongo endófito-bacteria *Pseudomonas*.

Nótese el gran antagonismo registrado contra esta bacteria en todos los endófitos estudiados, excepto en el endófito A4 (Tabla 14).

Tabla 14. Valoración *in vitro* del hongo endófito con la bacteria *Pseudomonas*.

BACTERIA: <i>Pseudomonas</i>	
Endófito A4	-
Endófito A13	+
Endófito AX	+
Endófito A7	+

4. Conclusiones

Los taxa fúngicos más frecuentes fueron: *Alternaria*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Phoma*, *Coelomycetes*, el mayor porcentaje de infestación correspondió a los denominados «*Mycelia sterilia*» (micelios estériles) siendo de particular interés su actividad antagonista.

Esta investigación sobre la presencia de endófitos fúngicos en las plantas (*Chuquiragua jussieui*) Y ñachag (*Bidens andicola* Kunth) consideradas medicinales en la farmacopea homeopática nacional, demostró que varias especies de hongos y, especialmente, los micelios estériles aislados, podrían constituir un óptimo y quizás inocuo material biológico para investigaciones futuras, en particular por la marcada actividad antagónica con hongos y bacterias fitopatógenas. Considerando como perspectivas futuras el uso de estos microorganismos para la elaboración y formulación de productos para el control biológico de enfermedades fitopatógenas, causadas por hongos y bacterias. El porcentaje más elevado de antagonismo se da con el hongo AX (micelios estériles) con un porcentaje del 89,1% frente a *Colletotrichum gloeosporoides* agente causal de la antracnosis en el tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae*) (Cav) Sendt Solanaceae. En cuanto a bacterias fitopatógenas, se consideran los cuatro géneros *Agrobacterium Sp.*; *Erwinia Sp.*; *Pseudomonas Sp.*; y *Xanthomonas Sp.* Agentes causales de mayor incidencia, en vegetales, los resultados de igual manera son muy satisfactorios, según lo encontrado.

Agradecimiento:

A las Dras. Marinella Rodolfi y Solveig Tossi Senior Research Scientist Sezione di Micologia Dipartimento di Ecologia del Territorio Università di Pavia – Italia por la predisposición y asesoramiento, en la presente investigación. A mis estudiantes de la cátedra de Biotecnología, por el apoyo y respaldo en la presente investigación.

Referencias

Ainsworth, G.C. 1971. **Dictionary of the fungi**. VI ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 616 pp.

Aldous, D.E., Isaacs, S. and Mebalds, M.I. 1999. **Endophytes in the genus Neotyphodium are not found in Australian native grasses**. Australasian Plant Pathol. 28(3), 183-186.

Andrews, J.H. 1984. **Life history strategies of plant parasites**. In Ingram, D.S. and Williams P.H. (eds.), Advances in Plant Pathology – Vol. 2. Academic Press, London, 303 pp.

Andrews, J.H. 1992. **Fungal life history strategies**. In Carrol, G.C. and Wicklow, D.T. (eds.), the fungal community: its organization and role in ecosystem. 2nd Ed. Dekker, New York, pp. 119-146.

Andrews, J.H. and Rouse, D.I. 1982. **Plant pathogens and the theory of r- and K- selection**. American Nat. 120, 283-296.

Andrews, J.H. and Hirano, S.S. (eds.), Microbial Ecology of Leaves. Springer-Verlag, New-York, pp. 358-375.

- Bacon, C.W. and Williamson, J.W. 1992. **Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn.** Mycopath. 117, 65-71.
- Bacon, C.W., Lyons, P.C., Porter, J.K. and Robbins, J.D. 1986. **Ergot toxicity from endophyte-infected grasses: a review.** Agron. J. 78, 106-116.
- Bacon, C.W. and Siegel, M.R. 1988. **Endophyte parasitism of tall fescue.** J. Product. Agricult. 1, 45-55.
- Barklund, P. and Unestam, T. 1988. **Infection experiments with *Gremmienia abietina* on seedlings of Norway spruce and scots pine.** Eur. J. For. Pathol. 18, 409-420.
- Barret, J.A. 1983. **Plant-fungus symbioses.** In Futuyma, D.J. and Slatkin, M. (eds.), *Coevolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, pp. 137-160.
- Barret, J.A. 1986. **Host-parasite interactions and systematics.** In Stone, A.R. and Hawksworth, D.L. (eds.), *Coevolution and Systematics*. Clarendon Press, Oxford, pp. 1-17.
- Carrol, G.C. (1988). **Fungal endophytes in stems and leaves: from latent insect pathogen to mutualistic symbiont.** Ecology 69, 2-9.
- Carrol, G.C. 1991. **Beyond pest deterrence – Alternative strategies and hidden costs of endophytic mutualisms in vascular plants.**
- Carrol, F.E., Müller, E. and Sutton, B.C. 1977. **Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers.** Sydowia pp. 29, 87-103.
- Dalla Valle, E. and Zechini D'Aulerio, A. 1989. **Antagonismo in vitro tra *Trichoderma viride* e *Rhizoctonia solani* isolata da *Pathos*.** Micologia Italiana pp. 3, 71-76.
- Dreyfuss, M. and Petrini, O. 1984. **Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants.** Botánica Helvetica pp 94, 33-40.
- Dreyfuss, M. 1989. **Microbial diversity. Microbial Metabolites as sources for new drugs.** Princeton Drug Research Symposia, Princeton, pp. 213
- De Bary, A. 1866. **Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten.** Vol. II. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany, Leipzig.
- Luppi-Mosca, A.M. 1960. **Sobre la micoflora del terreno de un bosque de *Pinus nigra* var. *Laricio*.** An. Inst. Bot. A.J. Cavanilles pp.18, 91-108.
- Neill, J.C. 1941. **The endophytes of *Lolium* and *Festuca*.** New Zealand J. Sci. Technol. pp 23, 185- 93.
- Petrini, O. 1981. **Fungal endophytes of tree leaves.** In Andrews, J.H. and Hirano, S.S. (eds.), *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New-York, pp. 179-197.
- Petrini, O. 1986. **Taxonomy of endophytic fungi in aerial plant tissues.** In Fokkema, N.J. and van den Heuvel, J. (eds.), *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge, pp.175-187.
- Petrini, O. and Dreyfuss, M. 1981. **Endophytische Pilze in epiphytischen *Araceae*, *Bromeliaceae* und *Orchidaceae*.** Sydowia pp. 34, 135-145.
- Petrini, O., Fisher, P.J. and Petrini, L.E. 1992. **Fungal endophytes of bracken (*Pteridium aquilinum*) with some reflections on their use in biological control.** Sydowia pp. 282-293.
- Rodrigues, K.F. (1992). **Endophytic fungi in the tropical palm *Euterpe oleracea* Mart.** Ph. D. Thesis City University of New York, Lehman College, pp. 258
- Rodrigues, K.F. (1996). **Fungal endophytes of palm.** In Redlin, S.C. and Carras, M.L. (eds.), *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 121-132.
- Rodrigues, K.F. and Samuels, G.J. (1990). **Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm.** Mycol. Res. pp. 94, 827-830.
- Rodrigues, K.F. and Samuels, G.J. 1992. **Species endophytic in palms.** Mycotaxon 43, 271-276.
- Sridhar, K.R. and Raviraja, N.S. (1995). **Endophytes – A crucial issue.** Current Sci. 69, 570-571.
- Pearce, M.H. (1990). **in vitro interactions between *Armillaria luteobubalina* and other wood decay fungi.** Mycol. Res. 94, 753-761.
- Varese, G.C. and Luppi-Mosca, A.M. (1991). **Funghi rizo-planici di *Fagus sylvatica* L. e loro interazioni.** Giorn. Bot. Ital. 125, 254.
- Watanabe, T. (1980). **A new variety of *Verticillium sp-haerosporum* an endoparasite of nematode and its antagonism to soil-borne plant pathogens.** Ann. Phytopathol. Soc. Japan 46, 598-606.
- Wennström, A. (1994). **Endophyte: the misuse of an old term.** Oikos 71, 535-536.
- Wennström, A. and Ericson, L. (1994). **The effect of the systemic smut *Urocystis***
- Wilson, R., Wheatcroft, R., Miller, J.D. and Whitney, N.J. (1995). **Genetic diversity among natural populations of endophytic *Lophodermium pinastri* from *Pinus resinosa*.** Mycol. Res. 98, 740-744.